

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0161238
(43) 공개일자 2023년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/53 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)*A61P 25/00* (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/53 (2013.01)*A23L 33/105* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0061002

(22) 출원일자 2022년05월18일

심사청구일자 2022년05월18일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

이동성

광주광역시 광산구 선운중앙로 45, 101동 201호(선암동, 선운 모아엘가)

이환

경상남도 진주시 진주대로 1317, 109동 203호(이현동, 이현하이클래스웰가아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리체

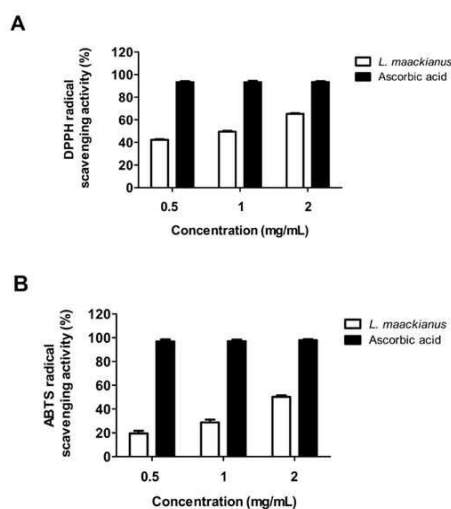
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **애기쉽싸리 추출물을 포함하는 항산화 및 항염증용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 애기쉽싸리 추출물을 포함하는 항염증용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 애기쉽싸리 추출물을 포함함으로써 다양한 염증 물질, iNOS, ROS 및 COX-2 등의 발현을 저해하고, NF- κ B 및 p65의 활성을 억제하며 HO-1의 발현을 증가시켜 뇌세포 및 신경세포 등에서의 항염증 효과가 우수한 항염증용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

유지명

광주광역시 동구 백서로166번길 15-5, 303호(서석동)

동임사

광주광역시 동구 백서로166번길 15-5, 303호(서석동)

우은란

광주광역시 동구 밤실로 147, 107동 1005호(산수동, 두암타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711075087

과제번호 2018R1C1B6001913

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 극초단파 추출법 및 3D in vitro 스크리닝법 동시 활용 피부질환 개선 천연물 소재

발굴연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 조선대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

애기쉽싸리 추출물을 포함하는 항염증용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 애기쉽싸리 추출물은 물, C₁-C₅ 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 항염증용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 뇌세포 및 신경세포 보호 작용을 하는, 항염증용 조성물.

청구항 4

애기쉽싸리 추출물을 포함하는 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 신경 염증 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 질환, 헌팅턴병, 피크병, 크로이츠펔츠-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축성측색경화증, 염증성 및 신경병증성 통증 및 뇌혈관질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 애기쉽싸리 추출물은 물, C₁-C₅ 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 뇌세포 및 신경세포 보호 작용을 하는, 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 8

애기쉽싸리 추출물을 포함하는 인지능력 향상 및 기억력 개선용 식품 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 애기쉽싸리 추출물은 물, C₁-C₅ 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 인지능력 향상 및 기억력 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항염증용 조성물, 신경 염증 질환의 치료용 약학 조성물, 인지능력 향상 및 기억력 개선용 건강기능 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 활성산소종이라 불리는 ROS(reactive oxygen species)는 인체의 대사과정에서 자연스럽게 발생되며, 과도한 운동, 환경 호르몬 등 인체의 산화적 스트레스로 발생되기도 한다. 활성산소종의 종류로는 hydroxyl radical(OH), superoxide radical(O^{2-}), hydrogen peroxide(H_2O_2) 등이 있는데, 과발현된 ROS는 생체내의 세포막, 단백질, DNA 손상 등을 일으키는 원인이 된다. 따라서 기능성 식품, 화장품 및 의약품 산업에서는 이러한 ROS를 제거하기 위하여 갈산 프로필(propyl gallate:PG), 디부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole:BHA), 디부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene:BHT) 등의 합성 항산화제를 사용하여 왔으나, 많은 연구에서 이들 합성 항산화제가 암을 유발하거나, 세포내 독성을 나타내는 등의 부작용을 초래한다고 보고하였다. 이러한 이유로 합성 항산화제보다 더 안전하고 효과적인 천연 항산화제를 찾고자 하는 연구가 지속되어 오고 있으며, 민간요법이나 한방에서 효능이 입증된 육상생물을 이용한 천연 항산화제 연구를 위주로 수행하여 왔다. 국내에 자생하는 식물은 총 205과 1,157속 4,940종으로 우리나라와 국토 면적이 비슷한 영국(2,000여종), 덴마크(1500 여종)와 비교하면 상당히 다양성이 높으며, 같은 동북아시아 국가인 일본, 중국보다 다양한 종이 분포하고 있어서 이들을 이용한 기능성 소재 개발은 반드시 필요하다,

[0004] 애기쑥싸리(*Lycopus maackianus*)는 산과 들의 습한 곳에서 자란다. 높이 30~70cm이다. 흰 땅속줄기가 옆으로 나며 줄기는 곧게 서고 네모진다. 가지를 내기도 하며 마디에 흰 털이 난다. 잎은 마주나고 넓은 바소 모양이며 윤이 나고 길이 4~8cm, 나비 5~15mm이다. 끝은 뾰족하고 밑은 둥글며 가장자리에 날카로운 톱니가 있다. 아랫부분의 잎은 가장자리가 깊이 패어 들어간 모양이다. 꽃은 7~8월에 흰색으로 피는데, 잎겨드랑이에 여러 개가 모여 달린다. 꽃받침은 5갈래로 갈라지고 갈래조각은 삼각꼴의 바소 모양으로서 끝이 매우 뾰족하다. 화관은 짧은 통처럼 생긴 입술 모양으로서 윗입술은 얇게 2갈래, 아랫입술은 3갈래로 갈라진다. 수술은 2개, 암술은 1개로서 모두 꽃 밖으로 나온다. 열매는 분열과로서 10월에 익는다. 어린 잎은 나물로 먹고 한방과 민간에서 포기 전체를 말려 산후부종, 종기, 뱀에 물렸을 때 치료제로 쓴다. 한국(제주도, 전라남도, 경상남도, 경기도, 함경북도), 일본, 중국(둥베이) 등지에 분포한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2059620호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 김승현, 「알츠하이머병 및 퇴행성 질환에서 면역-염증 기전의 역할」, (대한신경과학회지, 20(6), 2002), 575-584쪽

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 항산화 및 항염증용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 인지능력 향상 및 기억력 개선용 건강 기능 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 1. 애기썩싸리 추출물을 포함하는 항염증용 조성물.
- [0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 애기썩싸리 추출물은 물, C₁-C₅ 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 항염증용 조성물.
- [0014] 3. 위 1에 있어서, 뇌세포 및 신경세포 보호 작용을 하는, 항염증용 조성물.
- [0015] 4. 애기썩싸리 추출물을 포함하는 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [0016] 5. 위 4에 있어서, 상기 신경 염증 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 질환, 헌팅턴병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축성측색경화증, 염증성 및 신경병증성 통증 및 뇌혈관질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [0017] 6. 위 4에 있어서, 상기 애기썩싸리 추출물은 물, C₁-C₅ 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [0018] 7. 위 4에 있어서, 뇌세포 및 신경세포 보호 작용을 하는, 신경 염증 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [0019] 8. 애기썩싸리 추출물을 포함하는 인지능력 향상 및 기억력 개선용 식품 조성물.
- [0020] 9. 위 8에 있어서, 상기 애기썩싸리 추출물은 물, C₁-C₅ 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 인지능력 향상 및 기억력 개선용 식품 조성물.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 조성물은 항산화 및 항염증 효과가 우수하다.
- [0023] 본 발명의 항염증용 조성물은 뇌세포 및 신경 세포를 비롯하여 다양한 세포에서의 항염증 효과가 있다.
- [0024] 본 발명의 약학 조성물은 신경 염증 질환의 예방 및 치료 효과가 있다.
- [0025] 본 발명의 식품 조성물은 인지능력 향상 및 기억력 개선 효과가 있다.
- [0026] 본 발명은 천연물 유래 유효성분을 포함함으로써 부작용이 적은 의약품 및 건강기능식품으로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 애기썩싸리 추출물의 DPPH 및 ABTS에 대한 라디칼 소거 활성을 나타내는 그래프이다.
- 도 2는 LPS로 처리한 BV2 미세아교세포에 대한 애기썩싸리 추출물 농도에 따른 독성 평가 및 염증물질(Nitrite, PGE₂, IL-6, TNF- α) 생성 정도를 나타낸 그래프이다. * P < 0.05, *** P < 0.001 대조군과 비교, # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 LPS 처리된 집단군과 비교.
- 도 3은 LPS로 처리한 BV2 미세아교세포에 대한 애기썩싸리 추출물 농도에 따른 iNOS 및 COX-2 발현 조절 정도를 나타낸 그래프이다. * p < 0.05 LPS 처리된 집단군과 비교.
- 도 4는 LPS로 처리한 BV2 미세아교세포에 대한 애기썩싸리 추출물 농도에 따른 NK-kB p65 활성화에 대한 억제 효과를 나타낸 그래프이다. * p < 0.05 LPS 처리된 집단군과 비교.
- 도 5는 글루타메이트로 처리한 HT22 해마세포에 대한 애기썩싸리 추출물 농도에 따른 신경보호 효과를 나타낸

그래프이다. *** $p < 0.001$ 대조군과 비교, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ 글루타메이트 및 애기엡싸리 MeOH 추출물 처리된 집단군과의 비교.

도 6a 내지 6g는 BV2 및 HT22세포에 대한 애기엡싸리 추출물 농도에 따른 Nrf2/HO-1 단백질 발현의 효과를 나타낸 그래프이다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 대조군과의 비교, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ LPS/글루타메이트 및 애기엡싸리 MeOH 추출물 처리된 집단군과 비교.

도 7은 제브라피쉬 모델에 대한 애기엡싸리 추출물의 독성 평가, H_2O_2 처리한 제브라피쉬 모델에 대한 애기엡싸리 추출물 농도에 따른 항산화 효과 및 산화 스트레스를 유도한 제브라피쉬 모델에 대한 심박수 감소 효과를 나타낸 그래프이다. ** $p < 0.01$ 대조군과 비교, ## $p < 0.01$ H_2O_2 처리된 집단군과 비교.

도 8은 H_2O_2 로 처리한 제브라피쉬 모델에 대한 애기엡싸리 추출물 농도에 따른 세포 보호 효과 및 ROS 발생 저해 효과를 나타낸 그래프이다. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 대조군과 비교, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ H_2O_2 처리된 집단군과 비교.

도 9는 LPS로 처리한 제브라피쉬 모델에 대한 애기엡싸리 추출물 농도에 따른 항염증 효과, 세포보호 효과를 나타낸 그래프이다. ## $p < 0.01$ 대조군과 비교, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ LPS 처리된 집단군과 비교.

도 10은 LPS로 처리한 제브라피쉬 모델에 대한 애기엡싸리 추출물 농도에 따른 ROS 및 NO 발생 저해 효과를 나타낸 그래프이다. ## $p < 0.01$ 대조군과 비교, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ LPS 처리된 집단군과 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 애기엡싸리 추출물은 뇌세포 및 신경세포 보호 작용을 나타낸다.
- [0030] 애기엡싸리 추출물은 항염증 효과 및 신경 염증 질환의 치료 및 예방 효과를 나타낸다.
- [0031] 애기엡싸리 추출물은 NF- κ B 경로를 비활성화하여 질산화물, 프로스타글란딘 E2(PGE₂), 인터루킨-6(IL-6), 종양괴사 인자- α (TNF- α)의 생성을 억제하고 유도성 질산화물 합성효소와 사이클록시게나제-2 단백질 발현을 억제한다. 또한 애기엡싸리 추출물은 글루탐산염 유도 HT22 세포에 대하여 산화 스트레스에 의한 세포 손상으로부터 보호한다. 애기엡싸리 추출물은 heme oxyase-1(HO-1) 발현을 유도하고 핵에서 핵인자E2 관련 factor2의 변환을 증가시켜 항산화 및 항염증 효과를 나타낸다.
- [0032] 본 발명에서 애기엡싸리의 추출 용매는 특정의 것으로 제한되지 않는다. 예컨대 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등의 C₁-C₅ 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합 용매를 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 신경 염증 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 질환, 헌팅턴병, 피크병, 크로이츠펔츠-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축가쪽경화증, 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계자가면역질환, 다발성경화증, 염증성 및 신경병증성 통증 또는 뇌혈관질환을 포함한다.
- [0034] 애기엡싸리 추출물은 인지능력 향상 및 기억력 개선 효과가 있다.
- [0035] 본 발명의 약학 및 식품 조성물은 애기엡싸리 추출물 이외에 다른 유효성분 및 다양한 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학 및 식품 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 다양한 제형으로 된 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 추출물을 포함하는 식품으로는 예컨대 각종 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음료, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제 등이 있다.
- [0038] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0040] 실시예

[0041] 실시예 1. 재료 및 실험방법

[0043] 1-1. 재료 준비

[0044] 애기쉽싸리를 80℃에서 80% MeOH로 3시간 동안 환류하여 건조 애기쉽싸리(100g)를 얻었다. 원재료 대 추출용매의 비율은 1g/30mL로 유지되었으며, 두 번 추출 및 증발시켰다.

[0045] Fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RMI)-1640 medium 등 세포 배양 시약들은 Gibco BRL 주식회사(Grand Island, 뉴욕, 미국)에서 구입하였다.

[0046] p65, COX-2, iNOS, Nrf2, HO-1, 증식세포핵항원(PCNA), β -actin에 대한 1차 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

[0047] 모든 2차 항체는 Millipore(Billerica, MA, 미국)에서 구입하였다.

[0048] 모든 효소연계 면역항암제(ELISA) 키트는 R&D Systems(Minneapolis, MN, 미국)에서 구매하였다.

[0049] 다른 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0051] 1-2. 대사물 프로파일링 분석

[0052] 초고성능 액체크로마토그래피(UHPLC)를 이용한 Component profiling은 다음과 같은 조건에서 수행되었다. 사용된 분석 장비는 Water COTECs T3 column (1.6 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm; Waters Technologies, Milford, MA, USA)이 45℃로 유지되는 Dionex Ultimate 3000(Thermo Dionex, Sunnyvale, CA, USA)이었다. 크로마토그래피에서 이동상 용매 A는 물 중 0.1% 포름산(v/v)이었고, 용매 B는 아세트오닐트릴 중 0.1% 포름산(v/v)이었다. 크로마토그래피는 0분(1% B), 0-10분(5% B), 10-30분(30% B), 30-50분(100% B), 50-54분(100% B), 55-60분(1 % B)으로 Gradient 시스템 내에서 수행되었다.

[0053] 분석에 사용된 시료는 80% MeOH를 이용하여 20mg/mL 농도로 제조한 애기쉽싸리 MeOH 추출물 3 μ L이다. 유속은 0.3mL/분으로 설정되었다. 고해상도 질량분석법(HRMS)은 양이온 및 음이온 모드(electrospray ionization (+)-MS and electrospray ionization (-)-MS)에서 electrospray source를 사용하여 Triple time-of-flight(TOF) 5600+(AB Sciex, Framingham, MA, USA)에서 수행되었다. 사용된 MS 기기 설정은 다음과 같다.

[0054] 소스 온도, 500℃; MS 스캔 범위, 100내지 2000m/z(MS); 30 내지 2000m/z(MS/MS); 가스 압력, 50psi(분무, 가열) 및 25psi(커튼); 이온 스프레이 전압, 5500V(양) 및 4500V(음); 및 충돌 에너지 35 $\pm$ 15 eV. 데이터 수집 및 처리는 Elements Viewer 버전 2.1을 사용하여 수행되었으며 MS는 양이온 및 음이온 모드 모두에서 수행되었다.

[0056] 1-3. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성

[0057] DPPH 분석의 경우, MeOH에서 DPPH 용액을 용해하여 0.20mM을 준비하였다. 또한 3가지의 농도(0.5, 1, 2 mg/mL)로 추출물을 준비하였다. 준비된 DPPH 용액과 각 추출물은 3:1의 비율로 혼합되었다. 혼합 시료를 어둠 속에서 30분간 반응시킨 후 흡광도를 517nm로 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 다음 공식으로 대체하여 억제율(%)로 표현되었다.

[0058] DPPH 라디칼 소거 활성(%) = $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}} \times 100$

[0059] 여기서 A_{sample} 과 A_{control} 는 각각 시험 표본과 대조군의 흡광도이다.

[0061] 1-4. 2 2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS) 라디칼 소거 활성

[0062] ABTS 검사의 경우, 시약은 ABTS(7mM)와 potassium persulfate(140 mM)을 혼합하여 준비하였다. 활성산소의 형성을 유도하기 위해 혼합된 시약을 어둠 속에서 16시간 동안 반응시킨 다음 물로 희석시켰다. 희석된 시약과 추출물을 1:1 비율로 섞은 후 마이크로 플레이트에 뿌렸다. 상온에서 6분간 반응시킨 후 흡광도를 734nm로 측정하

였다. 통제 그룹은 100% MeOH를 사용하였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 다음 공식으로 대체하여 억제율(%)로 표현되었다.

[0063] $ABTS \text{ 라디칼 소거 활성}(\%) = (\text{Blank O.D.} - \text{표본 O.D.}) / \text{Blank O.D.} \times 100$

[0065] 1-5. 세포 배양 및 생존 가능성 분석

[0066] BV2 세포(5×10^5 cell/mL)는 열비활성화 FBS 10% 및 항생제 항균 용액(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 함유한 RPMI-1640에서 배양되었다. HT22 해마(hippocampus)는 열비활성화 FBS 10% 및 항생제 항균 용액을 함유한 DMEM에서 배양되었다. 세포 배양 조건으로 배양 온도 37°C와 5% CO₂ 에서 12-24시간 동안 배양하였다. 미토콘드리아 환원효소는 tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 포마잔(formazan) 결정으로 환원한다. 이를 이용해 애기엡싸리 추출물이 세포 생존성에 미치는 영향을 측정하였다. 세포 생존성을 측정하기 위해, 5mg/mL MTT는 각 cell suspension(1×10^5 cell/mL)에 4시간씩 처리되어 포마잔을 형성하였다. 형성된 포마잔은 DMSO에 용해되었고 흡광도는 540 nm로 측정되었다.

[0068] 1-6. 아질산염(Nitrite) 수위 결정

[0069] 아질산염 수치는 BV2 세포에서 NO 분비를 나타내는 지표로 평가되었다. 아질산염 수치는 세포배양용액과 Griess 시약을 같은 부피에서 혼합하여 반응하게 한 후 570 nm로 측정하였다.

[0071] 1-7. PGE₂ 수준 결정

[0072] BV2 세포는 48-well 플레이트(1×10^5 cell/mL)로 배양하여 다른 농도의 애기엡싸리 추출물로 3시간 동안 사전 처리한 후, LPS(24시간 동안 0.5 µg/mL)로 BV2 세포의 반응을 유도하였다. 입자 제거를 위해 상층액을 수집하였다. 그런 다음 앞에서 설명한 방법에 따라 ELISA 키트를 사용하여 PGE₂수준을 측정하였다.

[0074] 1-8. IL-6 및 TNF-α 수준 결정

[0075] BV2 세포를 24-well 플레이트(5×10^5 cells/well)에 깔고, 3가지의 다른 농도 애기엡싸리 추출물로 사전 처리하였다. 그 다음, 세포를 24시간 동안 LPS(0.5 µg/mL)로 반응시켰다. 배양 이후, IL-6과 TNF-α의 수준은 제조사의 지침에 따라 cytokine ELISA 키트를 사용하여 배지로부터 상층액을 수집하여 측정되었다.

[0077] 1-9. Western Blot 분석

[0078] 단백질 수준은 Western Blot 분석을 사용하여 결정되었다. 이를 위해 세포를 분리하고, 단백질분석 염료 시약 농축액(#5000006; Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 웨스턴 블롯팅은 앞에서 설명한 대로 수행되었다.

[0080] 1-10. 핵분열 및 핵분열 준비

[0081] 핵 추출 키트(Cayman, Ann Arbor, MI, USA)는 세포질과 핵을 분리하는 데 사용되었다. 추출된 각 부분은 제조업체가 제공한 프로토콜에 따라 분리하였다.

[0083] 1-11. NF-κB 국소화 및 면역형광

[0084] NF-κB의 국소화(localization)를 알아내기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다. BV2 세포는 Lab-Tek II 챔버 슬라이드에서 배양하여 애기엡싸리 추출물로 3시간 동안 처리한 후 0.5시간 동안 LPS로 처리하였다. 염색 프로

세스는 앞에서 설명한 대로 수행되었다. 염색 후, 세포를 Zeiss 형광 현미경(Provis AX70; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영하였다.

[0086] 1-12. 부모 제브라피쉬의 기원과 유지

[0087] 제브라피쉬는 서울아쿠아리움(서울, 한국)에서 구입해 28.5℃의 3-L 아크릴 물탱크에 14시간/10시간-빛/어둠 주기로 보관하였다. 제브라피쉬는 살아있는 brine shrimp(*Artemia salina*; 한국, 서울, Sewhapet food Co.)를 보충한 테트라민 플레이크를 먹이로 주 6일씩 하루 3회 공급되었다. 배아는 아침에 빛에 의해 유도된 자발적 산란을 통해 얻어졌다. 배아 채집은 30분 이내에 완료되었다. 제브라피쉬는 전남대학교 실험동물의 보호 및 사용에 관한 지침에 따라 처리되었다. 본 연구에 사용된 실험 프로토콜은 전남대학교 동물윤리위원회(No. CNU IACUC-YS-2020-8)의 승인을 받았다.

[0089] 1-13. HT22 세포의 ROS 수준 결정

[0090] HT22 세포는 48-well plates(1×10^5 cell/mL)로 배양하여 3시간 동안 애기쉽사리 추출물을 서로 다른 농도로 사전 처리하고, glutamate(24시간 동안 10 mM)로 유도한 후 배지를 제거하고 인산염 완충 식염수(PBS)에 10 μ M DCFH-DA를 적재하였다. 플레이트는 37℃의 인큐베이터에 돌려져 20분간 배양되었다. PBS로 워싱 한 후 멀티모드 판독기(BiotekTM Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader, Winooski, VT, USA)에서 형광 강도를 495nm의 자극 파장과 529nm의 방출 파장으로 측정하였다.

[0092] 1-14. 제브라피쉬 배아 LPS 및 H₂O₂ 처리

[0093] 동기화된 제브라피쉬 배아를 수집하여 수정 후 7-9시간 동안 2mL의 배아 배지를 함유하는 12-well 플레이트에 여섯 개의 배아 그룹으로 배열하였다. 이어서, 추출물을 그룹별로 처리하고 인큐베이션하였다. 다음으로, 산화스트레스 및 염증을 유도하기 위해, 5mM H₂O₂ 및 10g/mL LPS (최종 농도)를 처리하고, 1h 동안 인큐베이션한 다음, 28.5℃로 유지된 fresh embryo 배지로 옮겼다. 모든 실험은 배아 수정 7일 후의 제브라피쉬에서 진행 및 측정되었다.

[0095] 1-15. 제브라피쉬 배아의 세포사망 측정 및 이미지 분석

[0096] 제브라피쉬 배아는 7dpf에서 96-well 플레이트로 옮겨져 아크리딘 오렌지 용액(7g/mL)으로 처리됐다. 그 후 28.5℃의 어둠 속에서 30분간 배양하였다. 제브라피쉬 배아를 신선한 배아 배지에서 행구고 관찰 전에 2-페녹시에탄올(1/500 희석)을 사용하여 마취하고, CoolSNAP-Pro 컬러 디지털 카메라(올림푸스, 도쿄, 일본)를 사용하여 촬영하였다. 개별 유충의 형광 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0098] 1-16. 제브라피쉬 배아의 ROS 수치 결정 및 이미지 분석

[0099] 제브라피쉬의 ROS 생산은 형광 프로브 염료로 알려진 dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)를 사용하여 분석되었다. 7일차에는 제브라피쉬 배아를 well 플레이트로 옮겨 DCFH-DA(20 μ g/mL)로 처리하였다. 그런 다음 28.5℃의 어두운 방에서 1시간 동안 배양하였다. 제브라피쉬 배아는 신선한 배지로 세척되고, 관찰 전에 트리카인 메탄 설폰산염(tricaine methane sulfonate)을 사용하여 마취되었다. 사진은 Moticam color digital camera(Motix, Xiamen, China)를 이용해 촬영하였다. 형광 강도는 LS-5B 분광기(PerkinElmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 정량화하였다.

[0101] 1-17. 제브라피쉬 배아의 NO 수준 결정 및 이미지 분석

[0102] 제브라피쉬의 NO 생산은 diaminofluorophore 4-amino-5-methylamino-2-, 77-difluorofluorescein diacetate(DAF-FM-DA)를 사용하여 분석되었다. 7일차에는 제브라피쉬 배아를 well 플레이트로 옮겨 DAF-FM-

DA(5 μ M)로 처리하였다. 그런 다음 28.5°C의 어두운 방에서 1시간 동안 배양하였다. 다음 실험 과정은 제브라 피쉬 배아의 ROS 수준 결정 및 이미지 분석에서 설명한 것과 동일한 방법을 사용하여 수행되었다.

[0104] 1-18. 통계분석

[0105] 여기에 기술된 결과를 얻기 위해 최소 3개의 독립적인 실험이 수행되었다. 데이터는 세 가지 독립 실험의 평균 $\pm$ SD 편차로 표현된다. 모든 데이터는 일원 분산 분석을 사용한 후 Tukey의 다중 비교 검정을 사용하여 평가되었다. 통계 분석은 GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행되었다.

[0107] 실시예 2. 애기썩싸리 추출물의 UHPLC-TOF-HRMS 분석

[0108] 애기썩싸리의 MeOH 추출물에 대한 UHPLC-TOF-HRMS 크로마토그램 분석을 사용하여 10개의 화합물을 프로파일링하였다. 크로마토그램에 기인한 주요 피크는 전자분무 이온화-MS를 사용하여 포지티브 및 네거티브 모드 모두에서 관찰되었다. 또한, 화합물을 식별하기 위해 화합물의 MS 정보와 함께 관측된 이온 피크를 문헌에서 발견된 피크와 비교하였다. UHPLC-TOF-HRMS 분석은 10가지 화합물이 페놀, 사포닌, 배당체, 알칼로이드, 플라보노이드 및 테르페노이드로 구성된 것으로 나타났다(표 1).

표 1

[0110]

화합물	M	RT(분)	m/z Traces (+)	m/z Traces (-)	MS ²
5,6-epoxyeicosatrienoic acid	320.2	32.2	321.2		MS ² (+) [321.2]: 185.9, 211.8, 268.0, 286.4
1-naphthalenecarboxaldehyde	304.2	40.8	305.2		MS ² (+) [305.2]: 112.2, 260.8, 291.6
1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	495.3	42.8	496.3		MS ² (+) [496.3]: 105.0, 284.4, 478.8
Pheophorbide A	592.3	48.6	593.3		MS ² (+) [593.3]: 434.6, 463.4, 507.1, 534.1
N-acetylsulfamerazine	306.1	16.6		305.1	MS ² (-) [305.1]: 60.0, 97.2, 225.4, 305.5
(-)-12-hydroxyjasmonic acid	226.1	19.5	227.1		MS ² (+) [227.1]: 132.5, 149.3, 191.3, 210.1
Harderoporphyrin	608.3	48.1	609.3		MS ² (+) [609.3]: 531.5, 591.2, 610.2
all-trans-13,14-dihydroretinol	288.2	46.9	289.2		MS ² (+) [289.2]: 95.6, 110.0, 272.3, 289.7
17-methylene-4-androsten-3-one	284.2	36.5	285.2		MS ² (+) [285.2]: 96.0, 105.6, 119.0, 160.0, 211.9, 267.7
Sterebin	338.2	32.0		337.2	MS ² (-) [337.2]: 45.0, 253.8, 271.8, 337.7, 383.8

[0112] 실시예 3. 애기썩싸리 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

[0113] 애기썩싸리의 MeOH 추출물의 항산화 활성을 조사하기 위해 DPPH와 ABTS의 라디칼 소거 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 분석은 전자 공여로 인한 환원력을 측정하는 데 사용된다. 비교적 안정한 라디칼인 DPPH를 이용하여 항산화 활성을 측정하기 위한 방법으로서 DPPH 라디칼 소거 활성(DPPH radical scavenging assay)을 사용하

었다. 항산화제인 아스코르브산을 양성 대조군으로 사용하였다. MeOH 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성이 농도 의존적으로 증가하였다(도 1A). 항산화 활성을 측정하는 또 다른 방법으로 ABTS를 이용하여 애기엡싸리의 MeOH 추출물의 항산화 능력을 분석하였다. ABTS 라디칼 소거 활성 또한 농도 의존적으로 증가하는 결과를 보여주었다.

[0115] **실시예 4. 애기엡싸리 추출물의 염증 유발 매개체 및 사이토카인 생성 억제 효과**

[0116] LPS로 유도된 BV2 미세아교세포(microglia)의 항신경염증 효능을 애기엡싸리의 MeOH 추출물로 처리하여 조사하였다. 먼저 애기엡싸리 추출물을 50-400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 독성 평가를 수행하여 처리 농도를 결정하였다(도 2A). 독성은 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 발생하는 것으로 나타났다. 따라서 추출물의 최대 처리 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 설정하여 아질산염 생성에 대한 억제 효과를 확인하였다. 양성 대조군으로는 우수한 항염 효과가 있는 것으로 알려진 셀퍼레틴을 20 μM 농도로 비교하여 사용하였다. 애기엡싸리의 MeOH 추출물의 효과는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서의 대조군의 효과보다 우수하였다(도 2B). 그 후, PGE_2 의 생성이 농도 의존적 의존적 방식으로 억제되었음을 입증하였다(도 2C). 또한, 애기엡싸리 추출물은 농도 의존적 방식으로 IL-6 및 $\text{TNF-}\alpha$ 의 생성을 억제하였다(도 2D,E). 이러한 결과는 애기엡싸리의 MeOH 추출물이 LPS로 유도된 BV2 미세아교세포에서 염증 물질 생성을 유의하게 억제함을 보여준다.

[0117] 또한 염증 매개체에 대한 이러한 억제 효과가 iNOS 및 COX-2 발현 조절에 관여하는지 조사하였다. LPS 처리로 iNOS 및 COX-2 수준이 증가되었으나 애기엡싸리 추출물은 농도 의존적으로 LPS에 의한 iNOS 및 COX-2 수치를 증가를 억제하였다(도 3).

[0119] **실시예 5. 애기엡싸리 추출물의 NF- κB 억제 효과**

[0120] 염증 반응 동안 비정상적인 NF- κB 신호 전달은 염증 유발 매개체와 사이토카인의 과도한 분비를 유발한다. LPS로 자극된 BV2 세포에서 NF- κB 활성화에 대한 억제 효과를 Western blotting을 사용하여 조사하였다. 이 억제 효과를 조사하기 위해 애기엡싸리 추출물을 다양한 농도(25-100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 LPS 유도 BV2 세포에서 세포질 및 핵 분획을 추출하였다. 도 4A에서 보는 바와 같이, 애기엡싸리 추출물은 농도 의존적 방식으로 B-cell inhibitor, $\alpha(\text{I}\kappa\text{B}\alpha)$ 에서 kappa light 폴리펩타이드 유전자 인핸서의 핵 인자의 분해 및 p65의 핵 전위를 억제하였다(도 4A). 또한, LPS는 추출물에서 NF- κB 의 DNA 결합 활성을 증가시켰다(도 4B). 또한, 면역형광 분석은 LPS가 핵에서 NF- κB (p65) 전위를 유도했으며 애기엡싸리 추출물이 대조군에서 볼 수 있는 것과 비교하여 NF- κB 의 전위를 유의하게 억제함을 보여주었다(도 4C). 이러한 결과는 애기엡싸리 추출물이 I $\kappa\text{B}\alpha$ 인산화를 억제하여 LPS 자극에 의해 유도된 NF- κB (p65)의 핵전위를 억제함을 시사한다.

[0122] **실시예 6. 애기엡싸리 추출물의 신경 보호 효과(1)**

[0123] 글루타메이트는 CNS에서 중요한 신경전달물질이다. 그러나 여러 가지 원인으로 글루타메이트가 과분비되면 산화 스트레스를 유발하여 신경 세포 사멸을 초래한다. HT22 해마세포는 기억을 관장하며 고농도의 글루타메이트를 처리하면 산화적 스트레스로 인해 세포사멸이 일어난다. 애기엡싸리의 MeOH 추출물이 글루타메이트로 유도된 HT22 해마 세포에서 산화 스트레스로 인한 세포 독성에 대한 신경 보호 효과를 나타내는지 여부를 추가로 조사하였다. 먼저, 치료 처리 농도를 결정하기 위해 각 농도(50-400 $\mu\text{g/mL}$, 도 5A)에 대한 세포 독성을 평가하였다. 독성은 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 발생하였으므로 산화 스트레스에 대한 신경 보호 효과를 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 최고 농도로 설정하여 조사하였다. 애기엡싸리의 MeOH 추출물은 글루타메이트 유도 HT22 해마 세포에서 농도 의존적 신경 보호 효과를 보였다(도 5B). 한편, 도 5C는 ROS 생산 평가 결과를 보여준다. 대조군과 비교하여 ROS 생성은 글루타메이트 처리군에서 유의하게 증가하였다. 그러나 추출물 그룹의 ROS 생성은 크게 감소하였다.

[0125] **실시예 7. 애기엡싸리 추출물의 신경 보호 효과(2)**

[0126] 애기엡싸리 추출물의 항산화 효과가 HO-1에 의한 것인지 확인하기 위해 추출물을 사용하여 BV2 미세아교세포와 HT22 해마 세포를 12시간 동안 처리하였다. 정상 HO-1 발현은 HO-1 유도제인 코발트 프로토포르피린(CoPP)으로 처리하여 분석하였다. 애기엡싸리의 MeOH 추출물이 BV2 및 HT22 세포에서 HO-1 발현을 유의하게 유도한다는 것

이 입증되었다(도 6a,b). 따라서 이 추출물이 활성화된 Nrf2의 핵 전위에 미치는 영향을 조사하였다. Nrf2 발현은 BV2 및 HT22 세포에 100 µg/mL 애기썩사리 추출물을 처리한 후 0.5시간마다 측정하였다. 세포질 Nrf2가 BV2 및 HT22 세포 모두에서 핵으로 전위된 것으로 나타났다(도 6c,d). 또한 애기썩사리의 항염 효과가 HO-1 발현과 관련이 있는지 확인하기 위해 selective HO-1 inhibitor tin protoporphyrin-IX (SnPP)를 사용하여 실험을 수행하였다. 50 µM SnPP의 존재 또는 부재 하에 추출물로 전처리한 후, BV2 및 HT22 세포를 LPS(1 µg/mL) 및 글루타메이트(10mM)로 24시간 동안 처리하였다. 그 결과 애기썩사리 추출물은 SnPP를 함께 처리할 때보다 추출물 단독으로 처리한 LPS 유도 BV2 세포에서 아질산염 생성을 더 감소시키는 것으로 나타났다(도 6e). 또한, 애기썩사리의 MeOH 추출물이 HO-1 단백질 발현을 유도한다는 결과를 바탕으로 글루타메이트로 유도된 HT22 세포에서 항산화 스트레스의 신경보호 특성을 조사하였다. 글루타메이트 유도 HT22 세포에서 추출물과 SnPP를 동시에 투여했을 때보다 추출물만 투여했을 때 신경 보호 효과가 더 우수한 것으로 확인되었다(도 6f). 추출물을 사용한 ROS 감소 효과 또한 SnPP를 동시에 투여했을 때보다 추출물만 투여한 경우가 더 효과가 우수하였다(도 6g).

[0128] 실시예 8. H₂O₂로 자극한 제브라피쉬에서 애기썩사리 추출물의 항산화 효과

[0129] 제브라피쉬 모델을 H₂O₂와 추출물로 처리하여 생체 내에서 강력한 항산화 효과 발생 여부를 조사하였다. 먼저, 독성 평가를 수행하여 처리 농도를 결정하였다(도 7A). 생존율은 50 µg/mL에서 유의하게 감소하였다. 따라서 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도에서 실험을 수행하였다. 애기썩사리 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위해 5mM H₂O₂ 및 추출물의 각 농도(3.125-25 µg/mL)로 처리 후 7일째 생존율을 측정하였다(도 7B). 대조군과 H₂O₂ 처리군에서 생존율이 유의하게 감소하였고, 추출물 처리군에서 생존율이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 산화 스트레스로 인한 심박수의 변화도 측정되었다(도 7C). H₂O₂ 처리군은 대조군에 비해 심박수에서 유의한 감소를 보였다. 또한, 제브라피쉬의 세포 사멸 및 ROS 생성을 형광 현미경을 사용하여 측정하였다. 도 8A, B는 대조군에 비해 H₂O₂ 처리군에서 세포 사멸이 유의하게 증가했음을 보여준다. 그러나 추출물은 6.25, 12.5, 25 µg/mL에서 사멸을 유의하게 감소시켰다. 도 8C, D는 ROS 생성을 평가한 결과를 보여준다. 대조군에 비해 H₂O₂ 처리군에서 ROS 생성이 유의하게 증가하였다. 그러나 추출물은 6.25, 12.5, 25 µg/mL에서 ROS 생성을 유의하게 감소시켰다.

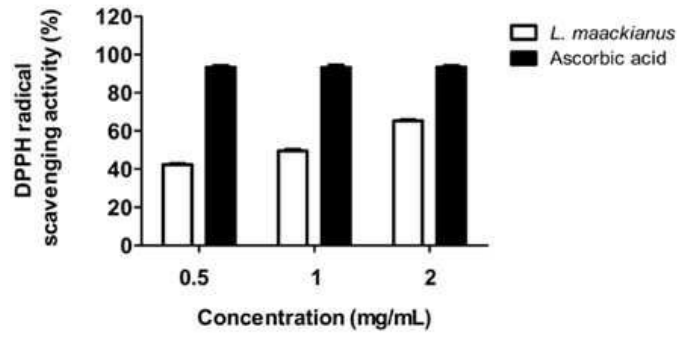
[0131] 실시예 9. LPS로 자극된 제브라 피쉬 모델에서 애기썩사리 추출물의 항염 효과

[0132] LPS로 자극된 제브라피쉬를 추출물로 처리하여 항염 효과를 조사하였다. 추출물은 독성 평가에서 결정된 대로 3.125-25 µg/mL로 투여되었다(도 9A). 먼저, LPS 처리 후 7일째에 생존율을 측정하였다(도 9A). 생존율은 대조군과 LPS 처리군에서 유의하게 감소하였고, 12.5 및 25 µg/mL 추출물 처리군에서 유의하게 증가하였다. 세포 사멸은 형광 현미경을 사용하여 측정되었다(도 9B). 세포 사멸은 대조군보다 LPS 처리군에서 유의하게 더 높았다. 그러나 추출물은 12.5 및 25 µg/mL에서 세포사멸을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. 도 10A,B에 나타난 바와 같이, ROS 생성은 대조군에 비해 LPS 처리군에서 유의하게 증가하였다. 그리고 ROS 생성은 추출물을 처리한 모든 그룹에서 유의하게 감소하였다. 도 10C,D에 나타난 바와 같이 NO 생성은 대조군에 비해 LPS 처리군에서 유의하게 증가하였다. NO 생성은 12.5 및 25 µg/mL 추출물 처리군에서 감소하였다.

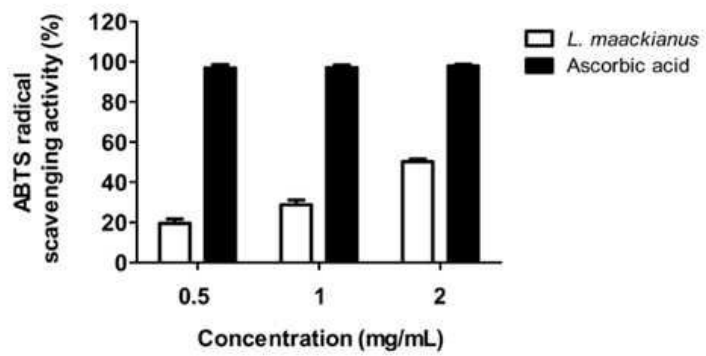
도면

도면1

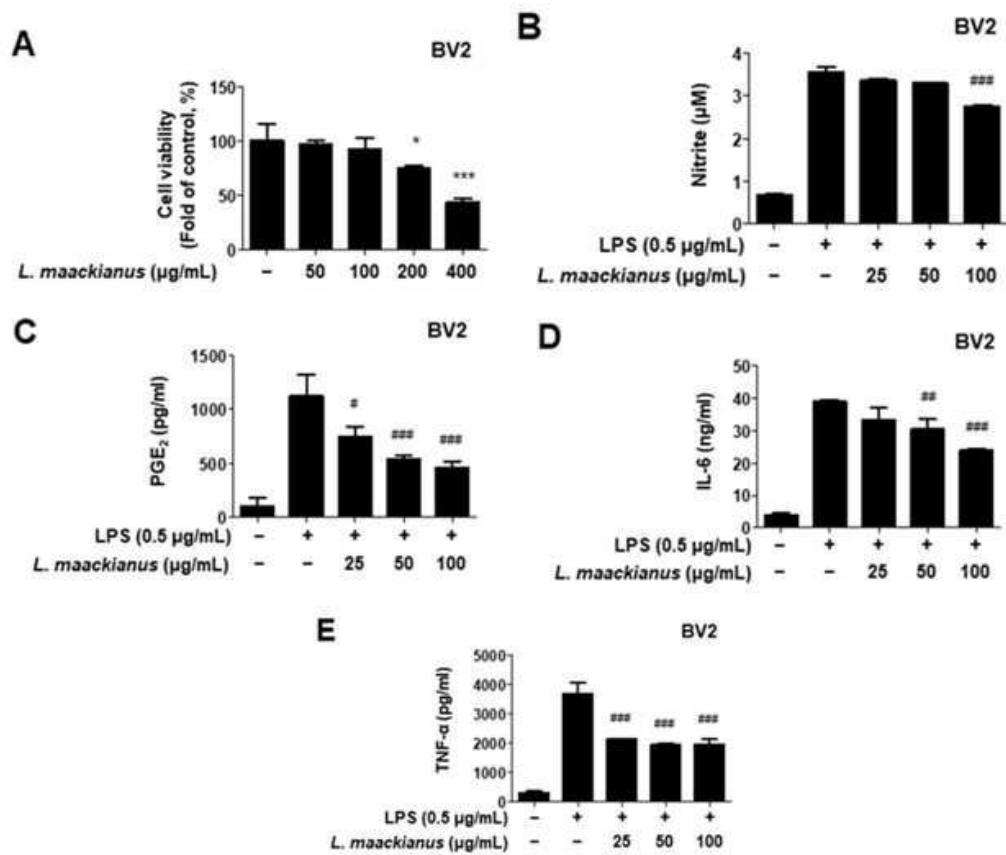
A



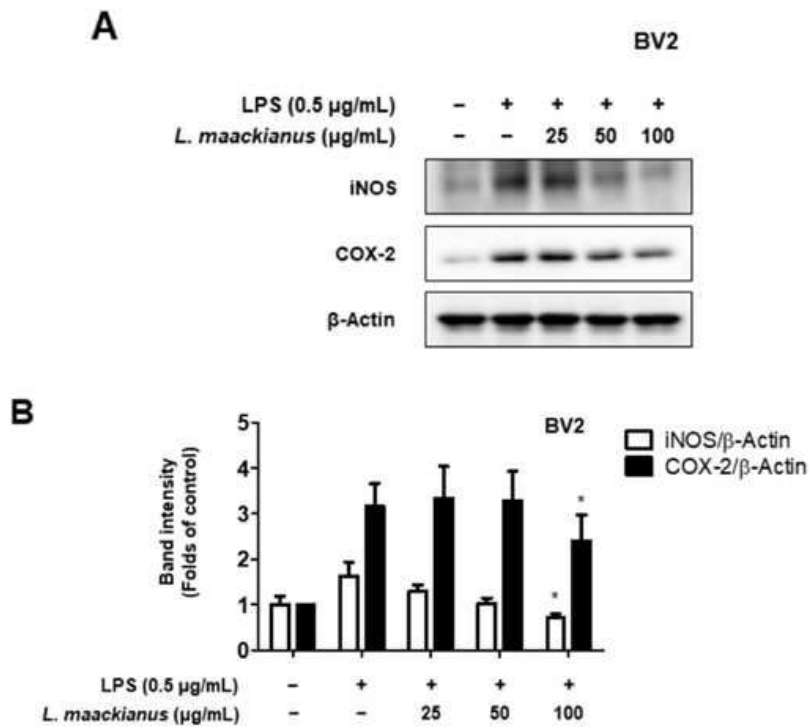
B



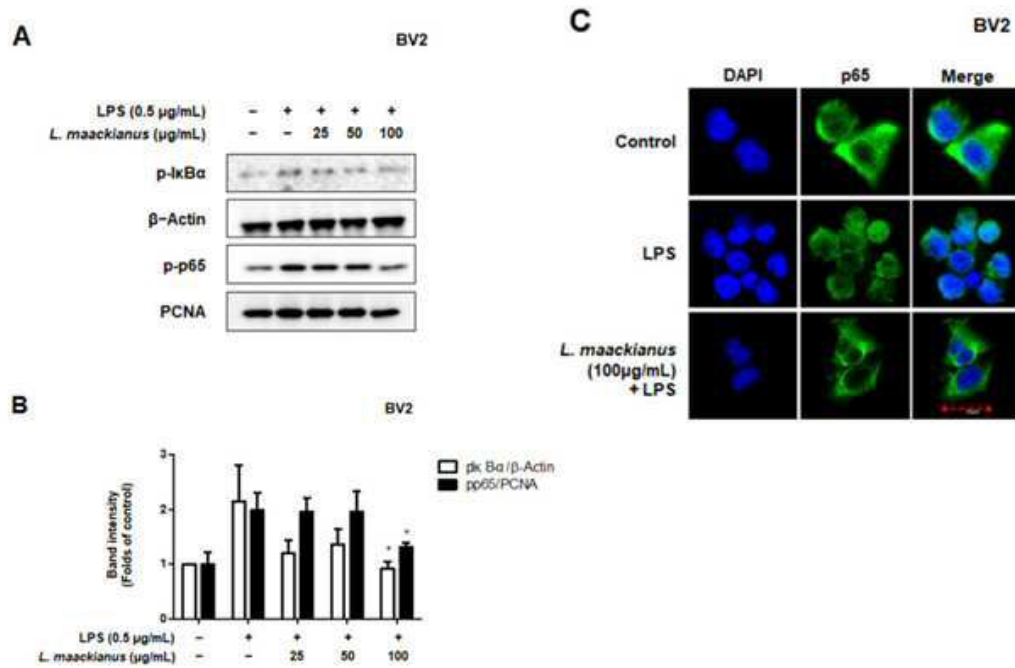
도면2



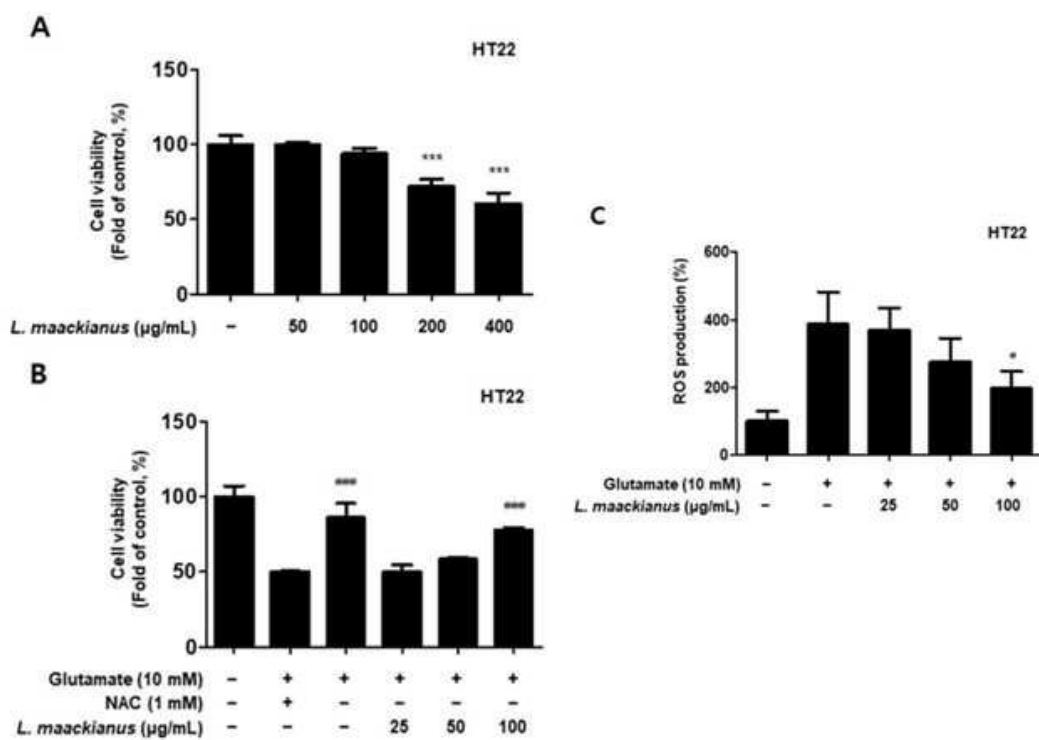
도면3



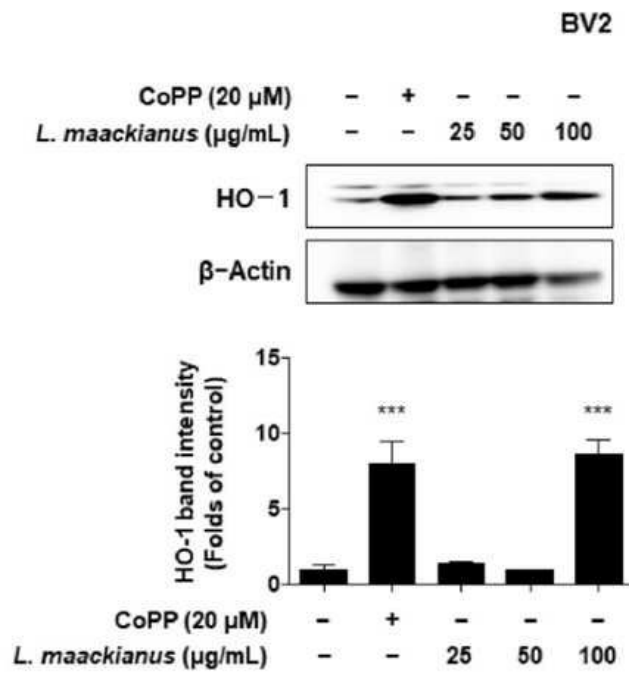
도면4



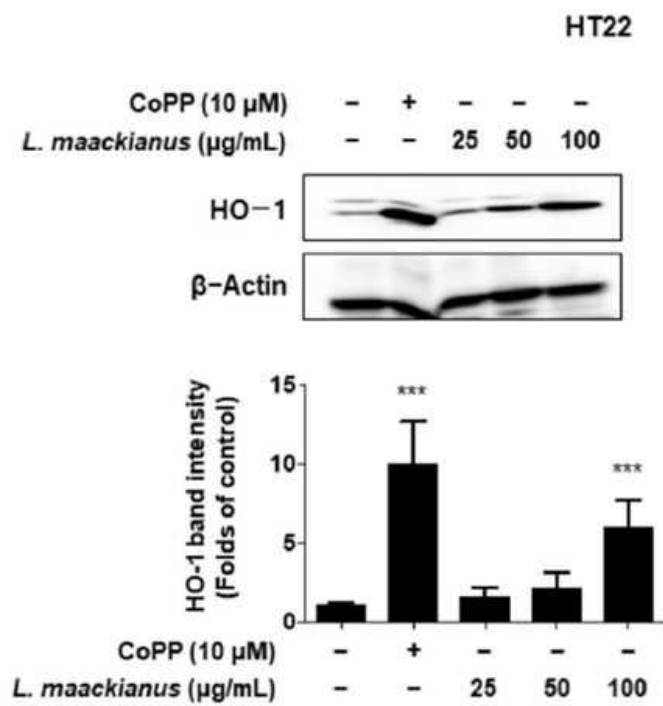
도면5



도면6a

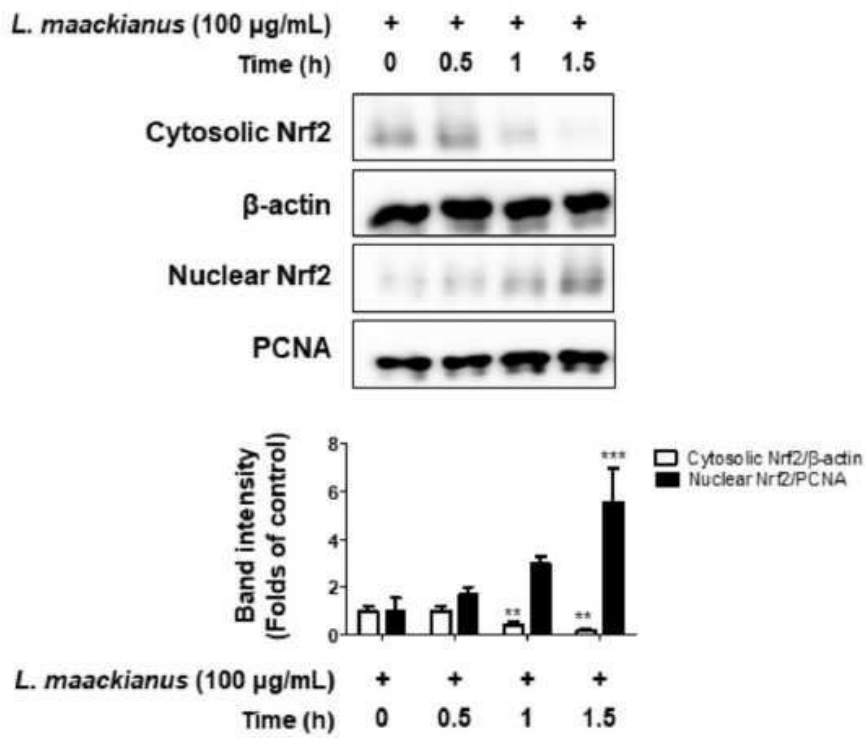


도면6b

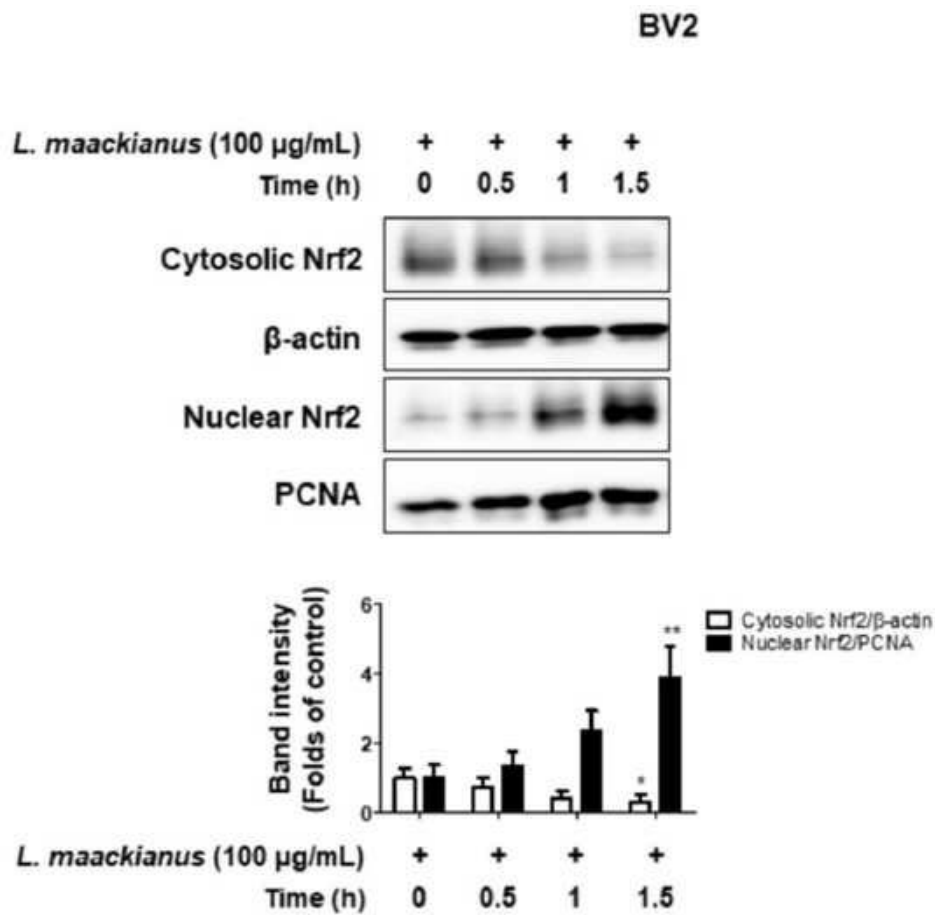


도면6c

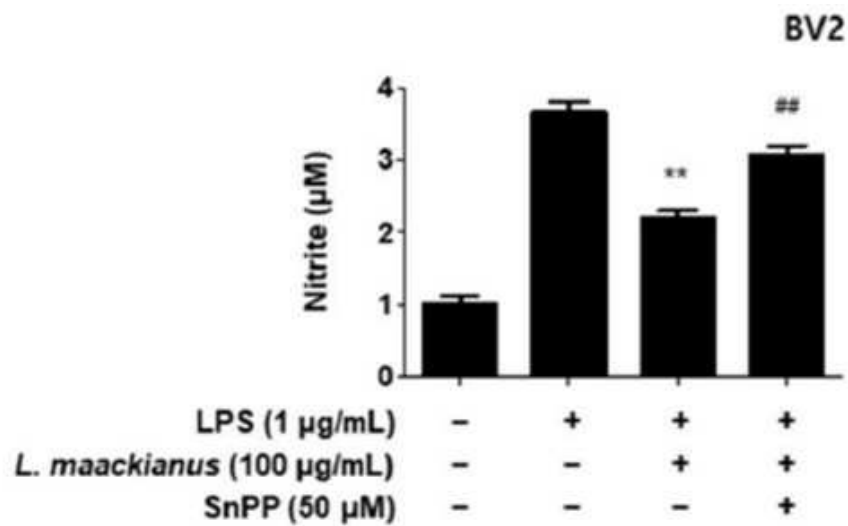
HT22



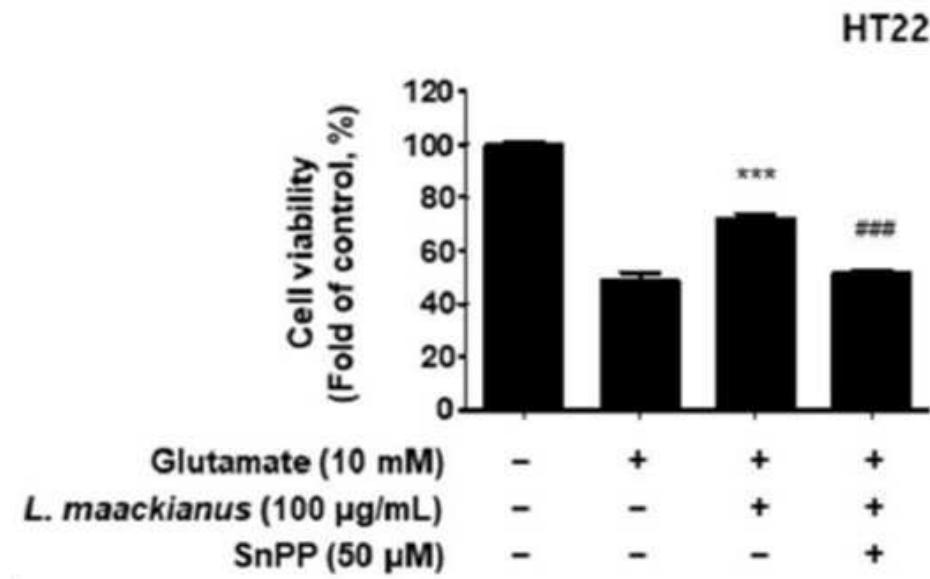
도면6d



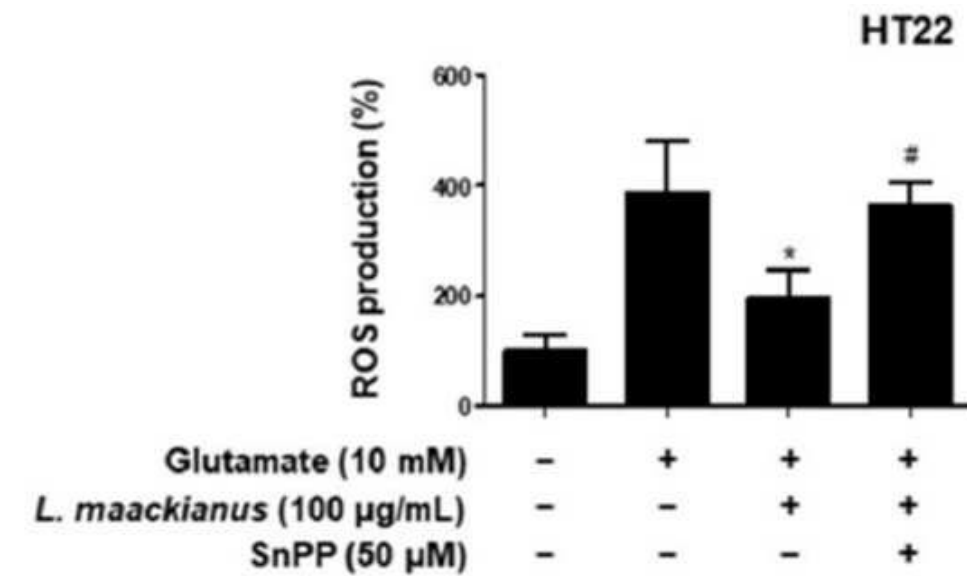
도면6e



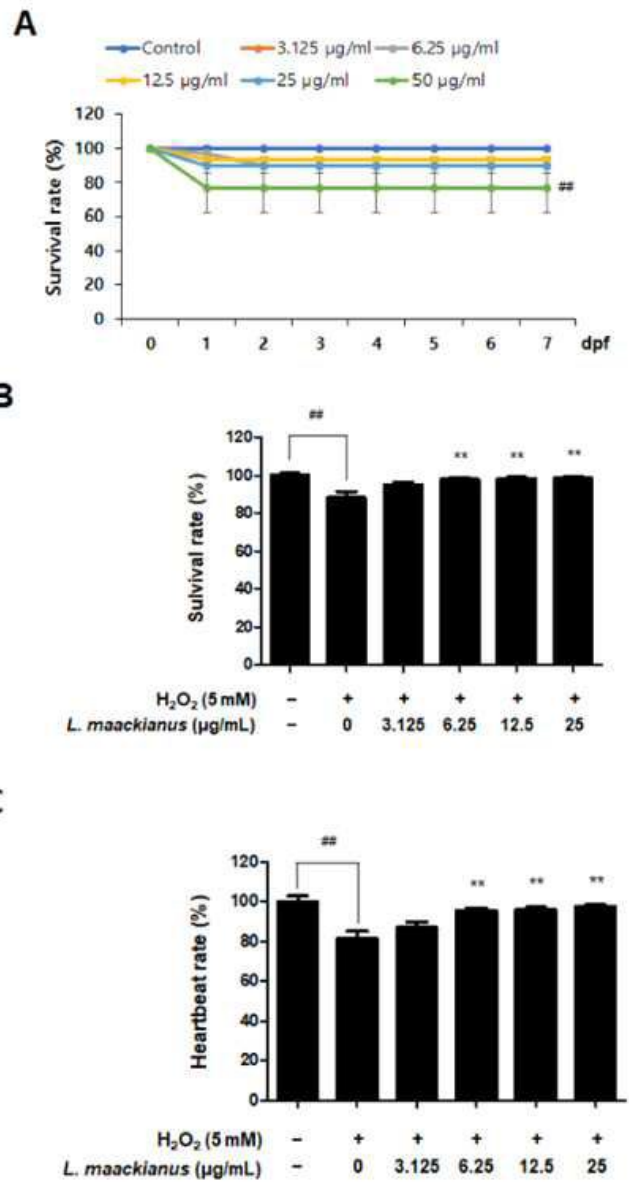
도면6f



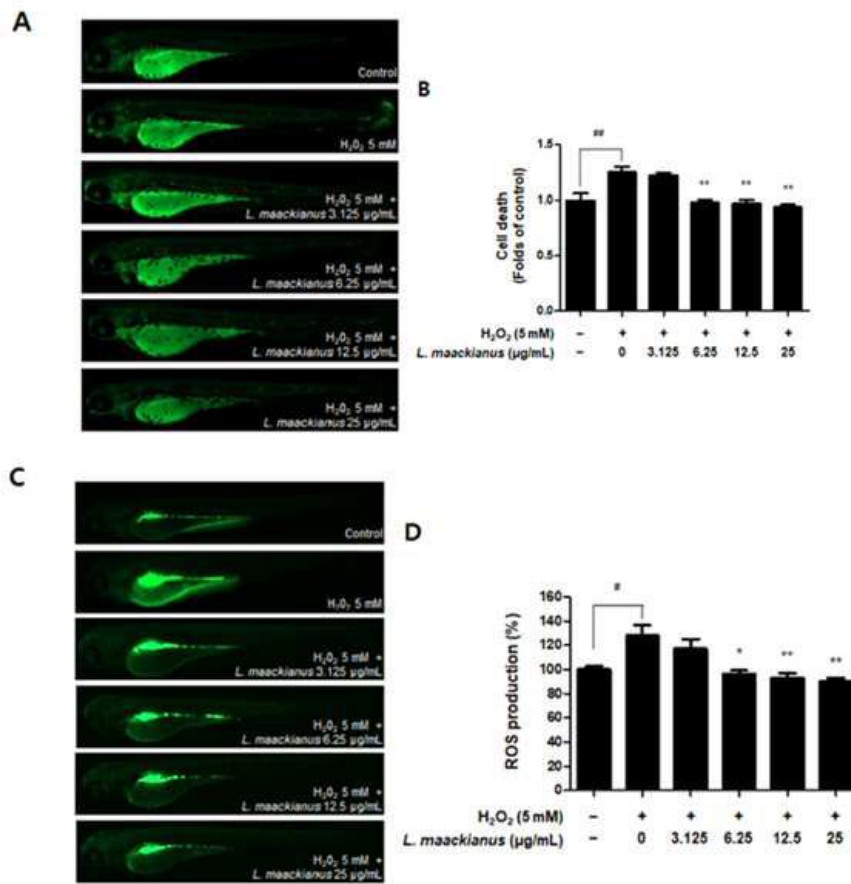
도면6g



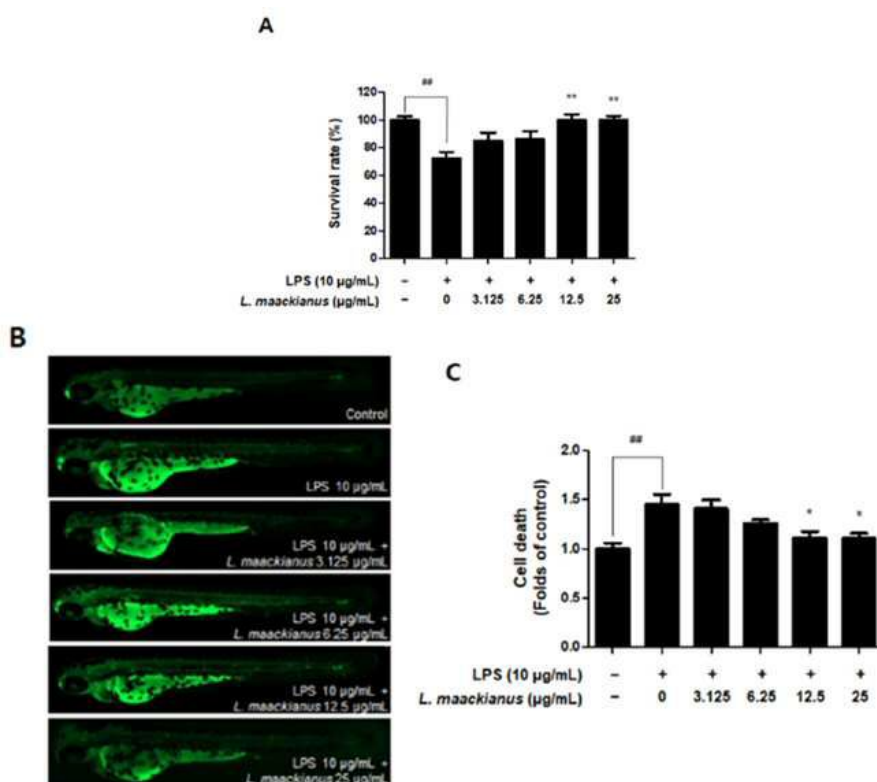
도면7



도면8



도면9



도면10

